

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(11)

## Process for the production of rhamnose or fucose.

Patenttinumero: EP0102535  
Julkaisupäivä: 1984-03-14  
Keksijä(t): VOELSKOW HARTMUT DR;; SCHLINGMANN MERTEN DR  
Hakija(t): HOECHST AG (DE)  
Pyydetty patentti: ☐ EP0102535  
Hakemusnumero: EP19830107721 19830805  
Prioriteettinumero (t): DE19823229700 19820810; DE19833300633 19830111  
IPC-luokitus C12P19/04; C13K13/00  
EC-luokitus C12P19/04, C13K13/00  
Vastineet: AU1782083, BR8304279, ☐ DD210074, DE3300633, ☐ DK363483,  
☐ ES8404412, FI832848, ☐ GR78922, NO832858, ☐ OA7517, ☐ PT77172

### Tiivistelmä

Fermentation with bacteria of the genera *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* or *Enterobacter* produces extracellular polysaccharides which are rich in rhamnose or fucose. These deoxysugars can, after acid hydrolysis of the polysaccharide, be isolated from the hydrolysate.

Tiedot otettu esp@cenetin tietokannasta - I2

## Selitys

Verfahren zur Herstellung von Rhamnose oder Fucose Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Rhamnose oder Fucose, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man durch Fermentation mit Bakterien der Gattungen *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* oder *Enterobacter* ein an diesen Desoxyzuckern reiches extracelluläres Polysaccharid erzeugt, dieses hydrolysiert und die gebildeten Desoxy- zucker abtrennt.

Die Desoxyzucker Rhamnose und Fucose sind auf chemischem Weg nur sehr schwer zugänglich. Es ist bekannt, dass zahlreiche Bakterien in der Lage sind, Desoxyzucker zu synthetisieren.

Lipopolysaccharide enthalten sehr häufig Rhamnose und/oder Fucose, ebenso zahlreiche extracelluläre Polysaccharide, jedoch jeweils nur in sehr geringen Mengen.

Es wurde nun gefunden, dass Bakterien der Gattungen *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* und *Enterobacter* extracelluläre Polysaccharide synthetisieren können, die mehr als 10 % Rhamnose und/oder Fucose enthalten, und dass diese Desoxyzucker aus den gebildeten Polysacchariden auch in guten Ausbeuten gewonnen werden können. Im folgenden werden bevorzugte Ausgestaltungen dieser Erfindung näher erläutert.

Eine Ausgestaltung des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, ein Bakterium der Gattung *Alcaligenes* in einem zuckerreichen Medium in belüfteter Submerskultur zu fermentieren, das gebildete Polysaccharid - nach vorheriger Isolierung und gegebenenfalls Trocknung oder unmittelbar - zu hydrolysieren und aus dem Hydrolysat die Rhamnose zu gewinnen.

Eine andere Ausgestaltung der Erfindung besteht darin, dass ein Bakterium der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere der aus der EP-PS 12 552 bekannte Stamm ATCC 31161, wie beschrieben fermentiert und aus dem rhamnosereichen Exopolysaccharid die Rhamnose isoliert wird.

Eine andere Ausgestaltung der Erfindung besteht darin, dass ein Bakterium der Gattung *Klebsiella*, insbesondere der Art *Klebsiella pneumoniae*, vor allem der aus der US-PS 3 507 69 bekannte Stamm ATCC 31488, wie beschrieben fermentiert und aus dem fucosereichen Exopolysaccharid die Fucose isoliert wird. Zahlreiche nichtpathogene Stämme wurden in letzter Zeit aus der Art *K. pneumoniae* ausgegliedert und der neuen Art *K. planticola* zugeordnet. Unabhängig von dieser Nomenklatur betrifft diese Ausgestaltung der Erfindung die Verwendung solcher Bakterien der Gattung *Klebsiella*, die fucosereiche Exopolysaccharide bilden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht darin, ein Bakterium der Gattung *Enterobacter*, vorzugsweise der Arten *Enterobacter cloacae* oder *Enterobacter sakazaki*, wie vorstehend beschrieben zu fermentieren und aus dem erhaltenen Polysaccharid Fucose zu gewinnen.

Die Auswahl geeigneter Stämme der genannten Bakterienarten erfolgt durch chromatographische Analyse der gebildeten Exopolysaccharide, die in üblicher Weise hydrolysiert werden, beispielsweise durch Papier-, Dünnschicht-, Hochdruckflüssig- oder Gaschromatographie geeigneter Derivate.

Als zuckerreiche Kulturmedien für die beschriebenen Verfahren dienen solche, die als Kohlenstoffquelle im wesentlichen Glucose, Saccharose, Lactose, Galactose, Fructose oder andere zuckerhaltige Rohstoffe wie Molke enthalten. Als Stickstoffquellen dienen anorganische Salze wie Natriumnitrat oder Ammoniumsalze und/oder organische Stickstoffquellen wie Cornsteep (Maisquellwasser), Hefeextrakt, Sojamehl oder dergleichen. Wird Molke als Zuckerquelle verwendet, so kann aufgrund ihres Eiweissgehaltes der Anteil der übrigen Stickstoffquellen verringert werden. Weiterhin enthalten die Kulturmedien die üblichen Salze und Spurenelemente.

Die Fermentationsbedingungen entsprechen den für Bakterien dieser Gattungen üblichen: Die Temperatur wird in einem Bereich von etwa 25 bis etwa 40°C, insbesondere etwa 30°C gehalten. Der pH-Wert wird auf einen Bereich von etwa 6 bis 7,5, insbesondere etwa 6,8 eingestellt und konstant gehalten. Die Kultur wird mit etwa 1 bis 2 l, vorzugsweise 1,5 l pro Minute und pro 1 Medium belüftet und gerührt.

Nach etwa 5 bis 7 Tagen ist der Zucker abgebaut und die Bakterien haben etwa 15 bis 25 g Polysaccharid pro Liter Medium, meistens etwa 20 g/l Medium, ausgeschieden. Der Gehalt an Rhamnose bzw. Fucose liegt bei leistungsfähigen Stämmen bei über 20 %, teilweise über 50 %.

Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgt in bekannter Weise, z. B. mit wässrigen Säuren wie Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Essigsäure, zweckmässig bei erhöhter Temperatur, vorzugsweise bei etwa 80 bis 120°C.

Die Hydrolyse ist im allgemeinen nach 4 bis 10 Stunden abgeschlossen. Je nach Art der eingesetzten Säure kann diese durch Destillation oder neutralisierende Fällung entfernt und die säurefreie zuckerhaltige Lösung in bekannter Weise aufgetrennt werden.

Je nach Zusammensetzung des Hydrolysats erfolgt die Abtrennung des gewünschten Desoxyzuckers durch chromatographische Methoden, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie, oder Adsorption an geeigneten oberflächenreichen Substanzen wie Zeolithen. Eine andere bevorzugte Aufarbeitung besteht darin, dass das Hydrolysat fermentativ aufgearbeitet wird, wobei die Nebenprodukte abgebaut werden und der gewünschte Desoxyzucker angereichert wird.

Die erfindungsgemäss erhältlichen Methylpentosen Rhamnose und Fucose eignen sich als Ausgangsstoff für die Synthese von Aromastoffen.

In den folgenden Beispielen beziehen sich Prozentangaben auf das Gewicht, sofern nichts anderes angegeben ist.

Beispiel 1 *Alcaligenes* sp. wird in einem Kulturmedium gezüchtet, das pro Liter die folgenden Inhaltsstoffe enthält: 50 g Glucose 0,005 g Fe(III)citrat  
1,5 g Cornsteep (trocken) 0,001 g MnSO<sub>4</sub>  
1,0 g NaNO<sub>3</sub> 0,0005 g ZnCl<sub>2</sub>  
1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,00012 g CuSO<sub>4</sub>  
0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,00011 g CoCl<sub>2</sub>  
0,015 g CaCl<sub>2</sub> 0,00012 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0 Die Temperatur der Kultur wird auf 30°C und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt und konstant gehalten. Die gerührte Kultur wird mit 1,5 l Luft pro Minute und pro Liter Medium versorgt. Nach 6 Tagen ist der Zucker abgebaut.

Pro Liter Kulturmedium wurden etwa 20 g Polysaccharid ausgeschieden, das zu etwa 50 % aus Rhamnose, 30 % Glucose, 15 % Galactose sowie etwa 5 % Fucose bestand.

Das Polysaccharid wurde mit wässriger Salzsäure bei etwa 100°C im Verlauf von 6 Stunden hydrolysiert. Anschliessend wurde der Chlorwasserstoff durch Destillation entfernt.

Das neutrale Hydrolysat wird auf eine Zuckerkonzentration von etwa 20 % mit Wasser verdünnt und 1 % Hefeextrakt, 0,6 % Harnstoff, 0,12 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,018 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 bis 6,5 wird mit einer Hefe der Art *Saccharomyces cerevisiae* beimpft, die die Glucose und Galactose aus dem gespaltenen Polysaccharid unter anaeroben Bedingungen bei 30 bis 37 °C zu Ethanol vergärt und die Desoxyzucker zurücklässt.

Im Kulturmedium kann anstelle der Glucose als Zucker auch Saccharose, Lactose, Galaktose, Mannose, Fructose oder Molke eingesetzt werden, wobei im Falle der Molke nach Bestimmung des Lactosegehalts ebenfalls etwa 50 g Zucker pro Liter eingesetzt werden. Aufgrund des Eiweissgehaltes der Molke wird der Anteil an Cornsteep und NaNO<sub>3</sub> entsprechend reduziert. Man erhält so zwischen 15 und 25 g Polysaccharid pro Liter, die zu 40 bis 60 % aus Rhamnose, 20 bis 40 % aus Glucose, 10 bis 20 % aus Galactose sowie 1 bis 5 % Fucose bestehen.

Die Hydrolyse kann anstelle von Salzsäure auch mit Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Essigsäure bei 80 bis 120°C im Verlauf von 4 bis 10 Stunden erfolgen. Nach der Hydrolyse kann die Essigsäure - wie die Salzsäure - durch Destillation entfernt werden, während Schwefelsäure und Phosphorsäure mit Hilfe von Calciumionen abgetrennt werden können.

Die Abtrennung der Glucose und Galactose aus dem Hydrolysat durch Vergärung kann anstelle von *Saccharomyces cerevisiae* auch mit anderen Hefearten, einzeln oder gemeinsam, erfolgen.

Aus dem Hydrolysat kann die Glucose auch durch das Enzym Glucoseoxydase in Gegenwart von Sauerstoff in Gluconsäure überführt werden, die bei pH 11 bis 12 mit Calcium- oder Magnesium-Ionen in Form der schwerlöslichen Salze abgetrennt werden kann. Hierbei bleiben die nicht umgesetzten Zucker im Überstand gelöst, woraus sie isoliert und, falls erforderlich, nach bekannten Methoden getrennt werden können.

Beispiel 2 Beispiel 1 wird in der Form abgewandelt, dass das Kulturmedium anstelle von NaNO<sub>3</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pro Liter 1 g Hefeextrakt und anstelle der 1,5 g Cornsteep 2 g enthält. Weiterhin wird anstelle von *Alcaligenes* sp. *Enterobacter sakazaki* eingesetzt. Die Kultivierungsparameter stimmen mit

Beispiel 1 überein.

In der Kultur werden nach 6 Tagen 16 g Polysaccharid pro Liter gebildet, wobei die Glucose zu 95 % abgebaut ist. Das Polysaccharid enthält etwa 30 S Fucose.

Arbeitet man anstelle von Glucose mit den anderen in Beispiel 1 genannten Zuckern bzw. Molke, so erhält man innerhalb von 5 bis 7 Tagen pro Liter Kulturmedium 12 bis 18 g Polysaccharid, das 20 bis 40 % Fucose enthält.

Beispiel 3 Das nach Beispiel 1 der EP-PS 12 552 erhaltene rhamnosereiche Exopolysaccharid wird gemäss Beispiel 1 aufgearbeitet und die Rhamnose isoliert.

Beispiel 4 Nach den Angaben der US-PS 4 350 769 wird ein fucost:reiches Exopolysaccharid erzeugt und gemäss Beispiel 1 aufgearbeitet.

---

Tiedot otettu esp@cenetin tietokannasta - 12

# Vaatimukset

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Rhamnose oder Fucose, da durch gekennzeichnet, dass man durch Fermentation mit Bakterien der Gattung Alcaligenes, Klebsiella, Pseudomonas oder Enterobacter ein an diesen Desoxyzuckern reiches extracelluläres Polysaccharid erzeugt, dieses hydrolysiert und die gebildeten Desoxyzucker abtrennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man mit Bakterien der Gattung Alcaligenes oder Pseudomonas ein rhamnosereiches Polysaccharid erzeugt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien des Pseudomonas-Stammes ATCC 31 461 eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man mit Bakterien der Gattung Enterobacter oder Klebsiella ein fucosereiches Polysaccharid erzeugt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Art Enterobacter sakazaki oder cloacae eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Art Klebsiella pneumoniae eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien des Stammes ATCC 31 488 eingesetzt werden.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentation unter aeroben Bedingungen bei 25 bis 40°C und in einem pH-Bereich von 6 bis 7,5 durchgeführt wird und das gebildete Polysaccharid bei erhöhter Temperatur mit Säuren hydrolysiert wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolyse bei 80 bis 120°C erfolgt.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung des gebildeten Desoxyzuckers durch Chromatographie, Adsorption oder fermentativen Abbau der Nebenprodukte erfolgt.

Tiedot otettu esp@cenetintietokannasta - 12

AU-A-17820/83

84-057319/10  
HOECHST AG

D17E13 (D16)

FARH 11.01.83  
\*DE 3300-633-A

10.08.82-DE-229700 (+ DE-300633) (01.03.84) C12p-19/02

Rhamnose or fucose prep. - by preparing desoxy-sugar-contg. extra-cellular polysaccharide by bacterial fermentation, hydrolysis and soxy-sugar sepn.

C14-024229

Prepn. of rhamnose or fucose comprises first producing an extra-cellular polysaccharide, rich in these desoxysugars, by fermentation with bacteria of Alcaligenes, Klebsiella, Pseudomonas or Enterobacter type. The prod. is hydrolysed, pref. with acid at 80-120°C and the desoxysugar formed is sepd., e.g. by chromatography, adsorption or by the fermentative degradation of by-prods.

#### USE

Rhamnose and fucose are used as starting materials for the synthesis of aroma materials.

#### ADVANTAGE

Polysaccharides contg. > 10% rhamnose and/or fucose can be synthesised. The desoxysugars are recovered in good yields.

#### DETAILS

D(5-C8)

E(7-A2).

011

A rhamnose-rich polysaccharide is produced with bacterin of the Alcaligenes or Pseudomonas type, esp. the Pseudomonas ATCC 31461 strain. A fucose-rich polysaccharide is produced with Enterobacter or Klebsiella type bacteria, esp. Enterobacter sakazaki or cloacae or Klebsiella pneumoniae, partic. the ATCC 31488 strain. Fermentation takes place under aerobic conditions at 25-40°C. at pH 6-7.5.

#### EXAMPLE

Alcaligenes sp. was cultivated in a culture medium contg., per l., 50 g glucose, 1.5 g cornsteep, 1 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and small amts. of CaCl<sub>2</sub>, Fe(III) citrate, MnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Cultivation took 6 days at 30°C. pH 6.8 with aeration 20 g Polysaccharide contg. 50% rhamnose, 30% glucose, 15% galactose and 5% fucose were sepd. from 1 l. culture medium. After hydrolysis with HCl, the neutral hydrolysate was dild. with water to sugar concn. 20%. After setting pH 6-6.5, and inoculating with Saccharomyces cerevisiae, glucose and galactose were fermented to EtOH under anaerobic conditions, leaving the desoxysugar. (app200HDDwNo 0/0).

DE3300633-A